



日本国特許庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
る事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
this Office.

願年月日
Date of Application:

1996年 7月24日

願番号
Application Number:

平成 8年特許願第213211号

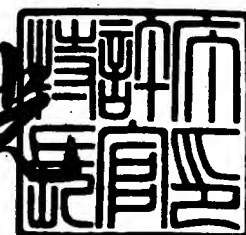
願人
Applicant(s):

トヨタ自動車株式会社

1997年 5月 2日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

荒井寿光



【書類名】 特許願

【整理番号】 964006

【提出日】 平成 8年 7月24日

【あて先】 特許庁長官 荒井 寿光 殿

【国際特許分類】 C12N 15/31

【発明の名称】 ファルネシルニリン酸合成酵素

【請求項の数】 14

【発明者】

 【住所又は居所】 愛知県豊田市トヨタ町1番地 トヨタ自動車株式会社内

 【氏名】 中根 弘之

【発明者】

 【住所又は居所】 愛知県豊田市トヨタ町1番地 トヨタ自動車株式会社内

 【氏名】 大音 徳

【発明者】

 【住所又は居所】 宮城県仙台市青葉区川内川前町48番地1 レジデンス
 広瀬102号

 【氏名】 大沼 信一

【発明者】

 【住所又は居所】 宮城県仙台市太白区桜木町1-30-310

 【氏名】 広岡 和文

【発明者】

 【住所又は居所】 宮城県仙台市青葉区南吉成2丁目15番地3

 【氏名】 西野 徳三

【特許出願人】

 【識別番号】 000003207

 【氏名又は名称】 トヨタ自動車株式会社

 【代表者】 和田 明広

【代理人】

 【識別番号】 100077517

【弁理士】

【氏名又は名称】 石田 敬

【電話番号】 03-5470-1900

【代理人】

【識別番号】 100087871

【弁理士】

【氏名又は名称】 福本 積

【代理人】

【識別番号】 100088269

【弁理士】

【氏名又は名称】 戸田 利雄

【代理人】

【識別番号】 100082898

【弁理士】

【氏名又は名称】 西山 雅也

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 008268

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9300159

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ファルネシルニリン酸合成酵素

【特許請求の範囲】

【請求項1】 プレニルニリン酸合成酵素のアミノ酸配列において、第二領域中に存在するアスパラギン酸リッチドメインDDXX (XX) D (配列中Xは任意のアミノ酸を表わし、カッコ内の2個のXは存在しない場合がある) のN-末端のDから5残基N-末端側に位置するアミノ酸残基～N-末端のDから1残基N-末端側に位置するアミノ酸残基及び前記アスパラギン酸リッチドメインのC-末端のDから1残基N-末端側に位置するアミノ酸残基の内の少なくとも1個が他のアミノ酸残基により置換されており、そして／又は前記アスパラギン酸リッチドメインのC-末端のDから1残基N-末端側に位置するアミノ酸残基と該C-末端のDとの間に追加のアミノ酸が挿入されている修飾されたアミノ酸配列を有する変異型プレニルニリン酸合成酵素。

【請求項2】 前記プレニルニリン酸合成酵素の反応産物が、ファルネシルニリン酸である、請求項1に記載の変異型酵素。

【請求項3】 前記プレニルニリン酸合成酵素が、ホモダイマー型である請求項1又は2に記載の変異型酵素。

【請求項4】 前記プレニルニリン酸合成酵素が、アーキア由来である請求項1又は2に記載の酵素。

【請求項5】 前記プレニルニリン酸合成酵素が、スルホロバス・アシドカルダリウス (*Sulfolobus acidocaldarius*) 由来である請求項1又は2に記載の変異型酵素。

【請求項6】 前記プレニルニリン酸合成酵素が、変異前のプレニルニリン酸合成酵素が有する特性を保持している請求項1又は2に記載の変異型酵素。

【請求項7】 前記プレニルニリン酸合成酵素が耐熱性酵素である、請求項1又は2に記載の変異型酵素。

【請求項8】 配列番号：1に示すアミノ酸配列を有するゲラニルゲラニルニリン酸合成酵素において、77位のフェニルアラニン、78位のスレオニン、80位のバリン、81位のヒスチジン及び84位のイソロイシンの内の少なくとも

も1個のアミノ酸が他のアミノ酸に置換されており、そして／又は84位のイソロイシンと85位のメチオニンの間にアミノ酸が挿入されている、請求項1又は2に記載の変異型プレニルニリン酸合成酵素。

【請求項9】 請求項1～8のいずれか1項に記載の酵素をコードするDNA。

【請求項10】 請求項9に記載のDNAから転写されるRNA。

【請求項11】 請求項9に記載のDNAを含んで成る組換えベクター。

【請求項12】 請求項11に記載の組換えベクターにより形質転換された宿主生物。

【請求項13】 請求項12に記載の宿主を培養し、培養物から発現生成物を採取する事を特徴とする、請求項1～8いずれか1項に記載の変異型酵素の製造方法。

【請求項14】 請求項1～8のいずれか1項に記載の酵素又は請求項13に記載の方法により製造される酵素を、イソペンテニルニリン酸、ジメチルアリルニリン酸、ゲラニルニリン酸から成る群から選択される基質に作用せしめることを特徴とする炭素数15以下のプレニルニリン酸の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、ステロイド、ユビキノン、ドリコール、カロテノイド、プレニル化蛋白質、動物ホルモン、植物ホルモンなどの生体にとって重要な化合物の前駆体である直鎖状プレニルニリン酸を合成する新規変異型酵素、該酵素をコードする遺伝子系、並びに該酵素の製造方法及び使用方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

生体内で重要な機能を持つ物質のうち、イソプレン (isoprene: 2-メチルー1, 3-ブタジエン) を構成単位として生合成される物質は数多い。これらの化合物はイソプレノイド (isoprenoid)、テルペノイド (terpenoid)、テルペン (terpene) と呼ばれ、炭素数によりヘミテルペン (hemiterpene, C₅)、モ

ノテルペン (monoterpene, C₁₀)、セスキテルペン (sesquiterpene, C₁₅)、ジテルペン (diterpene, C₂₀)、セスタテルペン (sesterterpene, C₂₅)、トリテルペン (triterpene, C₃₀)、テトラテルペン (tetraterpene, C₄₀)などに分類される。実際の生合成は、メバロン酸合成経路 (mevalonate pathway) を経て、メバロン酸-5-ニリン酸が合成され、活性型イソプレン単位であるイソペンテニルニリン酸 (IPP: isopentenyl diphosphate) が合成されるところから始まる。

【0003】

架空の前駆体物質として提唱されたイソプレン単位の真の姿は、結局、活性型イソプレン単位といわれるイソペンテニルニリン酸であった。イソペンテニルニリン酸の異性体であるジメチルアリルニリン酸 (DMAPP: dimethylallyl diphosphate) は植物ホルモンのサイトカイニンとして知られるイソペンテニルアデニンの反応基質に用いられもするが、イソペンテニルニリン酸との縮合反応によってゲラニルニリン酸 (GPP: geranyl diphosphate)、ネリルニリン酸 (neryl diphosphate)、ファルネシルニリン酸 (FPP: farnesyl diphosphate)、ゲラニルゲラニルニリン酸 (GGPP: geranyl geranyl diphosphate)、ゲラニルファルネシルニリン酸 (GEPP: geranyl farnesyl diphosphate)、ヘキサプレニルニリン酸 (HexPP: hexaprenyl diphosphate)、ヘプタプレニルニリン酸 (HepPP: heptaprenyl diphosphate) などの鎖状活性型イソプレノイドが合成されることが知られている。

【0004】

縮合反応にはZ型とE型がありゲラニルニリン酸はE型、ネリルニリン酸はZ型縮合産物である。ファルネシルニリン酸やゲラニルゲラニルニリン酸などでは全-E型が活性型と考えられるが、Z型縮合反応することによって天然ゴムやドリコール・バクトプレノール (ウンデカプレノール) や植物で見出だされる各種ポリプレノールが合成される。これらは分子内に持つピロリン酸と炭素骨格のリン酸エステル結合エネルギーを用いて縮合反応していくと考えられ、反応副産物としてはピロリン酸が生成すると考えられている。

【0005】

ファルネシルニリン酸やゲラニルゲラニルニリン酸が反応基質となり、細胞内シグナル伝達機構に重要なG蛋白質に代表されるプレニル化蛋白質（ファルネシルニリン酸・ゲラニルゲラニルニリン酸から）、アーキア（archaea）の細胞膜脂質（ゲラニルゲラニルニリン酸から）、ステロイド前駆体のスクアレン（ファルネシルニリン酸から）、カロテノイド前駆体のフィトエン（ゲラニルゲラニルニリン酸から）が合成される。6, 7イソプレン単位のヘキサプレニルニリン酸、ヘプタプレニルニリン酸から10イソプレン単位までのプレニルニリン酸は電子伝達系で機能するユビキノンやメナキノン（ビタミンK2）の合成前駆体となる。

【0006】

さらに、これら活性型イソプレノイド生合成を経由して次のような生命にとって重要且つ膨大な種類の化合物が合成されている。一部分の化合物を列記しても、ヘミテルペン合成前駆体とするものとしては植物ホルモンのサイトカイニンやイソペンテニルアデノシン修飾tRNAがあり、モノテルペンのゲラニオールとその異性体ネロールは薔薇油主成分の香料であり、楠抽出物の樟脳は防虫剤である。セスキテルペンとしては昆虫の幼若ホルモン（juvenile hormone）、ジテルペンとしては植物ホルモンのジベレリンや昆虫道しるべフェロモン（trail pheromone）、視色素前駆体や高度好塩古細菌の紫膜蛋白質結合成分やビタミンAとして機能するレチノール・レチナールがある。

【0007】

さらに、トリテルペンのスクアレンを合成前駆体として膨大な種類のステロイド系化合物が合成され、例えば動物の性ホルモンやビタミンD、昆虫の脱皮ホルモンのエクダイソン、植物ホルモンのプラシノライド、原形質膜成分などになる。種々の生物の色素・ビタミンA前駆体であるテトラテルペンの各種カロテノイドもまた、活性型イソプレノイド由来の重要な化合物であり、クロロフィル、フェオフィチン、トコフェロール（ビタミンE）、フィロキノン（ビタミンK1）もテトラテルペン由来の化合物である。

【0008】

アリル性(allylic)基質であるジメチルアリルニリン酸、ゲラニルニリン酸、

ファルネシルニリン酸、ゲラニルゲラニルニリン酸、ゲラニルファルネシルニリン酸などにイソペンテニルニリン酸を順次縮合していく活性型イソプレノイド合成酵素はプレニルニリン酸合成酵素と呼ばれ、主要反応産物の最大鎖長の化合物名に従って、例えば、ファルネシルニリン酸合成酵素 (FPP synthase) やゲラニルゲラニルニリン酸合成酵素 (GGPP synthase) などと呼ばれる。現在までにバクテリア、アーキア (archaea)、真菌、植物、動物からファルネシルニリン酸合成酵素、ゲラニルゲラニルニリン酸合成酵素、ヘキサプレニルニリン酸合成酵素、ヘプタプレニルニリン酸合成酵素、オクタプレニルニリン酸合成酵素、ノナプレニルニリン酸合成酵素 (ソラネシルニリン酸合成酵素)、ウンデカプレニルニリン酸合成酵素などの酵素の精製、活性測定、遺伝子クローニング・塩基配列決定が報告されている。

【0009】

産業的にも生命化学的にも重要かつ多岐にわたる化合物合成の根本をなすこれら活性型イソプレノイド合成酵素は、一般的に不安定で取り扱いが困難であり、かつ比活性も低く工業的な利用価値が望めなかった。ところが、ここ数年、好熱性のバクテリアやアーキアから耐熱性のプレニルニリン酸合成酵素が単離されたり、その遺伝子が取得され、酵素として利用可能な条件が整ってきた。

【0010】

ファルネシルニリン酸合成酵素では中等度好熱菌であるバシラス・ステアロサーモフィラス (*Bacillus stearothermophilus*) から遺伝子が単離され中等度の耐熱性を有する酵素が大腸菌を宿主細胞として製造された [T.Koyama et al. (1993) J. Biochem. 113, 355-363、平成3年特許出願公開第219961号]。ゲラニルゲラニルニリン酸合成酵素においては高度好熱性のスルホロバス・アシドカルダリウス (*Sulfolobus acidocaldarius*) 及びサーマス・サーモフィラス (*Thermus thermophilus*) の遺伝子が単離され [S.-i. Ohnuma et al. (1994) j. Biol. Chem. 269, 14792-14797、平成6年特許出願公開第308193号、平成7年特許願第294956号]、耐熱性の高い酵素が製造された。

【0011】

さらにファルネシルニリン酸合成酵素とゲラニルゲラニルニリン酸合成酵素の

機能をあわせもったプレニルニリン酸合成酵素も高度好熱性のメタノバクテリウム・サーモオートトロピカム (Methanobacterium thermoautotrophicum) より酵素及びそれをコードする遺伝子が単離され [A.Chen and D.Poulter(1993) J. Biol. Chem. 268, 11002-11007, A.Chen and D. Poulter(1994) ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS 314]、酵素の耐熱性が明らかにされている。

【0012】

しかしながら、メタノバクテリウム・サーモオートトロピカム (Methanobacterium thermoautotrophicum) 由来のファルネシルニリン酸／ゲラニルゲラニルニリン酸合成においては、酵素活性のアッセイに関して反応産物の薄層クロマトグラフ解析データなどの鎖長を特定する結果は報告されておらず、ゲラニルニリン酸をアリル性基質として測定することにより類推している。ゲラニルニリン酸はゲラニルゲラニルニリン酸合成酵素の基質とも成りうることから、単純にファルネシルニリン酸合成酵素活性のみが測定されているとは考え難い。

【0013】

さらに、ファルネシルニリン酸合成酵素においては、より高い耐熱性あるいは耐塩性あるいは低pH耐性の酵素を有すると考えられるアーキアにおいてはその存在が確認されていない。

上述のごとくバシラス・ステアロサーモフィラス (Bacillus stearothermophilus) 由来のファルネシルニリン酸合成酵素を利用することにより不安定で取り扱いが困難であるという問題の一部は解決された。しかし、より耐熱性の高い酵素の方が安定で工業的に取り扱いやすい。

【0014】

さらに、より長鎖長のプレニルニリン酸合成酵素にはファルネシルニリン酸を基質として作用するものが存在し、このような長鎖長プレニルニリン酸合成酵素とともにその基質を供給する目的でファルネシルニリン酸合成酵素を同時に作用させる場合、長鎖長プレニルニリン酸合成酵素と同等ないしはそれ以上の安定性を持つ酵素であることが要求される。また、工業的にファルネシルニリン酸を製造することを目的とした場合、酵素を固定化ないしは回収し、再生利用する事が必要になる。酵素を再生する場合酵素自身がより耐熱性が高く安定であるのみな

らず、より耐塩性が高いあるいはより広範囲のpHで安定であることが望まれる。

【0015】

【関連技術】

プレニルニリン酸合成酵素のアミノ酸配列解析から提唱されている2つのアスパラギン酸リッチドメインのうち、アミノ末端側のアスパラギン酸リッチドメイン保存配列I (DDXX (XX) D) (配列中、Xは任意のアミノ酸を表し、カッコ内の2個のXは存在しない場合がある、以下同じ) の5アミノ酸残基上流に位置するアミノ酸残基が反応産物の鎖長制御に関与することがわかり、反応産物鎖長を長くする目的をもって反応生成物を制御する方法は発明されている[平成8年7月3日出願の「変異型プレニル二リン酸合成酵素」と題する特許出願]。その方法により製造した酵素では数種の鎖長の反応生成物を生じさせる。しかし、ゲラニルゲラニルニリン酸合成酵素を変異させ反応生成物をより短鎖長側に制御し、ファルネシルニリン酸を生成させる方法は知られていない。

【0016】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、プレニルニリン酸合成酵素のアミノ酸配列を改変し、ファルネシルニリン酸合成酵素の製造方法を確立することにある。より安定性の高い、あるいは比活性の高い等の工業的に利用しやすい特性を有する新規酵素が得られれば、ただちに、この方法に従いアミノ酸残基を改変することにより、変異前のプレニルニリン酸合成酵素が有していた特性を保持したファルネシルニリン酸を生成する変異型プレニルニリン酸合成酵素およびその遺伝子を得ることが可能となる。

【0017】

【課題を解決するための手段】

変異型スルホバシ・アシドカルダリウス (*S. acidocaldarius*) のゲラニルゲラニルニリン酸合成酵素遺伝子の塩基配列情報から、プレニルニリン酸合成酵素のアミノ酸配列解析から提唱されている2つのアスパラギン酸リッチドメインのうち、アミノ末端側のアスパラギン酸リッチドメイン保存配列I (DDXX (XX) D) の内部のアミノ酸残基、又は該保存配列Iのアミノ末端側からN-末

端側のアミノ酸残基5個が反応産物の鎖長制御に関与することがわかった。

【0018】

従って本発明は、プレニルニリン酸合成酵素のアミノ酸配列において、第二領域中に存在するアスパラギン酸リッチドメインDDXX (XX) D (配列中Xは任意のアミノ酸を表わし、カッコ内の2個のXは存在しない場合がある) のN-末端のDから5残基N-末端側に位置するアミノ酸残基～N-末端のDから1残基N-末端側に位置するアミノ酸残基及び前記アスパラギン酸リッチドメインのC-末端のDから1残基N-末端側に位置するアミノ酸残基の内の少なくとも1個が他のアミノ酸残基により置換されており、そして/又は前記アスパラギン酸リッチドメインのC-末端のDから1残基N-末端側に位置するアミノ酸残基と該C-末端のDとの間に追加のアミノ酸が挿入されている修飾されたアミノ酸配列を有する変異型プレニルニリン酸合成酵素を提供する。

【0019】

本発明は変異前のプレニルニリン酸合成酵素が有していた特性を保持した、ファルネシルニリン酸を生成する変異型プレニルニリン酸合成酵素を提供する。

本発明はまた、前記酵素をコードするDNA又はRNAを提供する。

本発明はさらに、上記DNAを含んで成る組換えベクター、特に発現ベクターを提供する。

本発明はさらに、上記ベクターにより形質転換された宿主を提供する。

本発明はまた、前記の酵素を、イソペンテニルニリン酸、ジメチルアリルニリン酸、ゲラニルニリン酸から成る群から選択される基質に作用せしめることを特徴とする炭素数15以下のプレニルニリン酸の製造方法を提供する。

本発明はさらに、前記の宿主を培養し、培養物から発現生成物を採取することを特徴とする、請求項1～8のいずれか1項に記載の製造方法を提供する。

【0020】

【発明の実施の形態】

プレニルニリン酸合成酵素（ヘテロダイマーの場合は一方のサブユニット）のアミノ酸配列には5つの保存領域があることが提唱されている [A. Chen et al., Protein Science Vol.3, pp.600-607, 1994]。また、これら5個の保存領域

の内、第II領域中にアスパラギン酸リッチドメイン保存配列I「DDXX (XX) D」(この配列中、Xは任意のアミノ酸を表わし、カッコ内のXXは存在しない場合がある)ことが知られている。なお、第V領域にも「DDXXD」で示されるアスパラギン酸リッチドメインが存在するが、本発明においてアミノ酸配列の改変部位を特定するために用いるアスパラギン酸リッチドメインは第II領域に存在するものであり、第V領域に存在するアスパラギン酸リッチドメインIIに対して、アスパラギン酸リッチドメインIとして区別する。

【0021】

上記のごときアスパラギン酸リッチドメインを有するプレニルニリン酸合成酵素としては、ファルネシルニリン酸合成酵素、ゲラニルゲラニルニリン酸合成酵素、ヘキサプレニルニリン酸合成酵素、ヘプタプレニルニリン酸合成酵素、オクタプレニルニリン酸合成酵素、ノナプレニルニリン酸合成酵素、ウンデカプレニルニリン酸合成酵素等が挙げられる。さらに具体的な例として、バシラス・ステアロサーモフィラス (Bacillus stearothermophilus) のファルネシルニリン酸合成酵素、エセリシア・コーライ (Escherichia coli) のファルネシルニリン酸合成酵素、サッカロミセス・セレビスエ (Saccharomyces cerevisiae) のファルネシルニリン酸合成酵素、ラットのファルネシルニリン酸合成酵素、ヒトのファルネシルニリン酸合成酵素、ニューロスポラ・クラッサ (Neurospora crassa) のゲラニルゲラニルニリン酸合成酵素、サッカロミセス・セレビスエ (Saccharomyces cerevisiae) のヘキサプレニルニリン酸合成酵素、等があげられる。

【0022】

これらの内の幾つかの例として、ゲラニルゲラニルニリン酸合成酵素のアミノ酸配列における領域I～V、及び領域IIの中のアスパラギン酸リッチドメインI(わく内)を図1に示す。

本発明は、これらアスパラギン酸リッチドメインIを有する任意のプレニルニリン酸合成酵素に適用することができる。

【0023】

本発明によれば、プレニルニリン酸合成酵素のアミノ酸配列において、第二領域中に存在するアスパラギン酸リッチドメインDDXX (XX) D(配列中Xは

任意のアミノ酸を表わし、カッコ内の2個のXは存在しない場合がある)のN-末端のDから5残基N-末端側に位置するアミノ酸残基～N-末端のDから1残基N-末端側に位置するアミノ酸残基及び前記アスパラギン酸リッチドメインのC-末端のDから1残基N-末端側に位置するアミノ酸残基の内の少なくとも1個が他のアミノ酸残基により置換されており、そして/又は前記アスパラギン酸リッチドメインのC-末端のDから1残基N-末端側に位置するアミノ酸残基と該C-末端のDとの間に追加のアミノ酸が挿入されている。

【0024】

本発明の変異型プレニルニリン酸合成酵素は、変異前のプレニルニリン酸合成酵素が合成するプレニルニリン酸の鎖長よりも短いファルネシルニリン酸を合成することができる。

本発明においては、具体例として、高度好熱性アーキアのスルホロバス・アシドカルダリウス (Sulfolobus acidocaldarius) のゲラニルゲラニルニリン酸合成酵素遺伝子を出発材料として用いる。スルホロバス・アシドカルダリウス (Sulfolobus acidocaldarius) は ATCC No.33909として、ATCCより入手することができる。この遺伝子のクローニング方法は特願平6-315572の明細書に詳細に記載されている。また、GenBank等の遺伝情報データベースでもアクセッション番号D28748で公開されており、その配列をプローブに用いれば広く知られた方法によりクローニングできる。さらに、他のクローニング方法の一例を本明細書に実施例1として記載すると共に、その塩基配列を配列番号:2として示す。

【0025】

本発明の変異型酵素は、さらに具体的には、配列番号:1に示すアミノ酸配列を有するゲラニルゲラニルニリン酸合成酵素において77位のフェニルアラニン、78位のスレオニン、80位のバリン、81位のスチジン及び、84位のイソロイシンの内少なくとも1個のアミノ酸が他のアミノ酸に置換されており、そして/又は84位のイソロイシンと85位のメチオニンの間にアミノ酸が挿入されている、請求項1又は2に記載の変異型プレニルニリン酸合成酵素である。

本発明においては、具体例として、配列番号:1に示すアミノ酸において下記

のごとくアミノ酸配列が置換されたアミノ酸配列を有する酵素を挙げることができる。

【0026】

変異酵素1：78位のスレオニン→フェニルアラニン及び81位のヒスチジン→アラニンの変化

変異酵素2：78位のスレオニン→フェニルアラニン及び81位のヒスチジン→ロイシンの変化

変異酵素3：77位のフェニルアラニン→チロシン、78位のスレオニン→フェニルアラニン及び81位のヒスチジン→ロイシンの変化

変異酵素4：77位のフェニルアラニン→チロシン、78位のスレオニン→フェニルアラニン及び81位のヒスチジン→アラニンの変化

変異酵素5：77位のフェニルアラニン→チロシン、78位のスレオニン→セリン、80位のバリン→イソロイシン、84位のイソロイシン→ロイシンの変化及び84位のイソロイシンと85位のメチオニンの間にプロリンとセリンの挿入。

【0027】

本発明においては、変異型プレニルニリン酸合成酵素が変異前のプレニルニリン酸合成酵素の有していた特性を保持することを示す。具体例として、上述5つの変異型酵素が変異前のゲラニルゲラニルニリン酸合成酵素と同等の耐熱性を示す。

酵素はその生来のアミノ酸配列に比べて1又は少数個のアミノ酸の付加、除去、及び／又は置換によって修飾されている場合でもその本来の酵素活性を有する場合があることが知られている。従って、本発明は配列番号1に示されるアミノ酸配列に対して1又は少数個、例えば5個まで、又は10個までのアミノ酸が置換、欠失及び／又は付加により変化しているアミノ酸配列を有し、なお生来の機能を果たすことができる酵素も包含する。

【0028】

本発明はまた、上記の種々の変異型酵素をコードする遺伝子及びそれを含むベクター、特に発現ベクター、及び該ベクターにより形質転換された宿主を提供す

る。本発明の遺伝子（DNA）は、例えば配列番号：1に示す生来のアミノ酸配列をコードするDNAに部位特定突然変異誘発やPCR法等の定法に従って変異を導入することにより容易に得ることができる。

さらに、一旦目的とする酵素のアミノ酸配列が定まれば、それをコードする適当な塩基配列を決定することができ、常用DNA合成法によりDNAを化学合成することもできる。

【0029】

本発明はまた、前記のごときDNAを含んで成る発現ベクター、該発現ベクターにより形質転換された宿主、及びこれらの宿主を用いての本発明の酵素又はペプチドの製造法を提供する。

発現ベクターはその複製開始点、発現制御配列等を含むが、これらは宿主により異なる。宿主としては、原核生物、例えば細菌、例えば大腸菌、バシラス属細菌、例えばバシラス・ズブチリス（Bacillus subtilis）、真核性微生物、例えば真菌、例えば酵母、例えばサッカロミセス（Saccharomyces）属に属するサッカロミセス・セレビスエ（S. cerevisiae）やピキア（Pichia）属に属するピキア・パストリス（Pichia pastoris）、糸状菌、例えばアスペルギルス・ニガー（A. niger）、動物細胞、例えばカイコの培養細胞、高等動物の培養細胞例えばCHO細胞等が挙げられる。また、植物を宿主とすることも可能である。

【0030】

本発明によれば、実施例に示すごとく、本発明のDNAにより形質転換した宿主を培養することにより、培養物中にファルネシルニリン酸を蓄積することができ、これを採取することによりファルネシルニリン酸を製造することができる。本発明によればまた、本発明の方法により製造した変異型プレニルニリン酸合成酵素を基質イソペンテニルニリン酸及び各アリル性基質、例えばジメチルアリルニリン酸、ゲラニルニリン酸に作用させることによってもファルネシルニリン酸を製造することができる。

【0031】

宿主に大腸菌を用いる場合を例に取れば、DNAからmRNAを転写する過程

と mRNA からタンパク質を翻訳する過程などの遺伝子発現調節機能があることが知られている。mRNA の合成を調整するプロモータ配列として、天然に存在する配列（例えば lac, trp, bla, lpp, P_L, P_R, ter, T7, T3 など）以外にも、それらの変異体（例えば lac UV5）や天然にあるプロモーター配列を人工的に融合した（例えば tac, trc など）配列が知られており、本発明にも使用できる。

mRNA からタンパク質を合成する能力を調節する配列として、リボソームバインディングサイト（GGAGG 及びその類似配列）配列と開始コドンである ATG までの距離が重要であることは既知である。また 3' 側に転写終了を指令するターミネーター（例えば、rrn PT₁ T₂ を含むベクターがファルマシア社から市販されている）が組換え体でのタンパク質合成効率に影響することはよく知られている。

【0032】

本発明の組換えベクターを調製するのに使用できるベクターとしては、市販のものをそのまま用いるか、または目的に応じて誘導した各種ベクターを挙げることができる。例えば、pMB 由来の repulicon を持つ pBR322, pBR327, pKK223-3, pKK233-2, pTrc99 等や、コピー数が向上するように改変した pUC18, pUC19, pUC118, pUC119, pTV118N, pTV119N, pBluescript, pHSG298, pHSG396 等、また p15A 由来の repulicon を持つ pACYC117 や pACYC184 等、さらには pSC101 や ColE1 や R1 や F 因子などに由来するプラスミドが挙げられる。

【0033】

さらに、より精製の容易な融合蛋白質発現ベクター例えば pGEX-2T, pGEX-3X や pMal-c2 のようなベクターも利用でき本発明の出発材料として用いた遺伝子の例が特願平 6-315572 に記載されている。

また、プラスミド以外にも、λファージや M13 ファージのようなウイルスベクターやトランスポゾンによっても遺伝子導入が可能である。大腸菌以外の微生物への遺伝子導入では、pUB110（Sigma 社から販売）や pHY300

PLK（宝酒造より販売）などによるバシラス属への遺伝子導入が知られている。これらベクターについては Molecular Cloning (J.Sambrook, E.F.Fritsch, T. Maniatis 著 Cold Spring Harbor Laboratory Press 発行) や Cloning Vector (P.H.Pouwels, B.B.Bnger, Valk, W.J.Brammar 著 Elsevier 発行) や各社カタログに記載されている。

【0034】

これらのベクターへの、プレニルニリン酸合成酵素をコードする DNA 断片及び必要により前記酵素の遺伝子を発現調節する機能を有する DNA 断片の組み込みは、適当な制限酵素とリガーゼを用いる既知の方法で行うことができる。こうして作製される発明のプラスミドの具体的なものとしては pBs-SacGGPS が挙げられる。

このような組換えベクターで遺伝子導入できる微生物としてはエシェリシアコリー (Escherichia coli)、バシラス属 (Bacillus) 属に属する微生物も利用することができる。この形質転換も常法、例えば Molecular Cloning (J.Sambrook, E.F.Fritsch, T. Maniatis 著 Cold Spring Harbor Laboratory Press 発行) や DNA Cloning Vol.I-III (D.M.Glover 編 IRL PRESS 発行) などに記載された、CaCl₂ 法やプロトプラスト法により行うことができる。

【0035】

本発明の変異型酵素を製造するには、上記形質転換された宿主を培養し、その培養物から常法に従って、例えば塩析、有機溶媒沈殿、ゲル濾過、アフィニティークロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー等により回収精製することができる。

本発明はまた、本発明の酵素を用いてファルネシルニリン酸を製造する方法を提供する。この方法においては、媒体、特に水性媒体中で、本発明の酵素とを反応せしめ、所望により反応媒体から目的とするプレニルニリン酸を採取すればよい。酵素としては、精製酵素のみならず、種々の段階まで半精製して得られる粗酵素、又は培養菌体もしくは培養物等の酵素含有物でもよい。また、前記の酵素、粗酵素又は酵素含有物を常法に従って固定した固定化酵素であってもよい。

【0036】

基質としてはジメチルアリルニリン酸または、ゲラニルニリン酸とイソペンテニルニリン酸とが用いられる。反応媒体としては水又は水性緩衝液例えばトリス緩衝液やリン酸緩衝液等が用いられる。

本発明で得られた変異型プレニルニリン酸製造法を用いれば、例えばより安定性が高く扱いやすいアーキア由来のファルネシルニリン酸を生成する変異型プレニルニリン酸合成酵素を創出することが可能となる。また、変異前のプレニルニリン酸合成酵素の特性を付与した例えば耐塩性あるいは広範囲のpHで安定なファルネシルニリン酸を生成する変異型プレニルニリン酸合成酵素の創出も期待できる。

特許請求の範囲と明細書中で、アミノ酸残基は以下の1文字表記または3文字表記の略号で示される。

【0037】

A ; A l a ; アラニン
C ; C y s ; システイン
D ; A s p ; アスパラギン酸
E ; G l u ; グルタミン酸
F ; P h e ; フェニルアラニン
G ; G l y ; グリシン
H ; H i s ; ヒスチジン
I ; I l c ; イソロイシン
K ; L y s ; リジン
L ; L e u ; ロイシン
M ; M e t ; メチオニン
N ; A s n ; アスパラギン
P ; P r o ; プロリン
Q ; G l n ; グルタミン
R ; A r g ; アルギニン
S ; S e r ; セリン
T ; T h r ; スレオニン

V ; V a l ; バリン

W ; T r p ; トリプトファン

Y ; T y r ; チロシン

【0038】

アミノ酸残基の置換は、「置換前のアミノ酸残基」、「アミノ酸残基番号」及び「置換後のアミノ酸残基」の順番で1文字表記のアミノ酸残基記号で表わし、たとえば81位のチロシン残基がメチオニン残基に置き換わった変異はY81Mと表す。また、アミノ酸残基の挿入は、「挿入される部位のN末端側の挿入前のアミノ酸残基番号」、「挿入されたアミノ酸残基」及び「挿入される部位のC末端側の挿入前のアミノ酸残基番号」で表し、例えば84位のアミノ酸と85位のアミノ酸の間にはアラニンが挿入された場合84A85と表す。

【0039】

【実施例】

本発明を実施例をあげて説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

実施例1. ゲラニルゲラニルニリン酸合成酵素遺伝子を含むプラスミドの作製

東洋紡績より市販されているプラスミドベクターpBluescript II (KS+) のHindIII 部位にスルホロバス・アシドカルダリウス (Sulfolobus acidocaldarius) 由来のゲラニルゲラニルニリン酸合成酵素 (以下S a c G G P Sと略す) 遺伝子をサブクローニングした。このプラスミドDNAをp B s - S a c G G P Sとする。S a c G G P S遺伝子は、平成 年 月 日付けで工業技術院生命工学工業技術研究所に国際寄託された微工研条寄第号 (F E R M B P) のエシェリシアコーライ (Escherichia coli) DH5α (p G G P S 1) より入手できる。

【0040】

また、S a c G G P S遺伝子の塩全基配列は平成6年特許願第053804号やShin-ichi Ohnuma et al.(1994) The Journal of Biological Chemistry Vol. 269, pp.14792-14797または、GenBank などの遺伝情報データベースでアクセッション番号D28748として公開されており、スルホロバス・アシドカルダリウ

ス (*Sulfolobus acidocaldarius*) も ATCC No. 33909 として ATCC などの各種微生物の寄託期間から入手可能なので、通常の遺伝子クローニング法によって SacGGPS 遺伝子部分の DNA を得ることができる。

【0041】

実施例 2. 変異導入用オリゴヌクレオチドの合成

ゲラニルゲラニルニリン酸合成酵素遺伝子の変異導入のため下記のようなオリゴヌクレオチドをデザインし合成した。

プライマー DNA (T78F, H81A) : 5' -CATACTTTTTCCTTGTGGCTGATGATATCATGGATC - 3' (配列番号: 3)

プライマー DNA (T78F, H81L) : 5' -CATACTTTTTCCTTGTGCTTGATGATATCATGGATC - 3' (配列番号: 4)

プライマー DNA (F77Y, T78F, H81L) : 5' -CATACTTATTCCTTGTGCTTGATGATATCATGGATC - 3' (配列番号: 5)

プライマー DNA (F77Y, T78F, H81A) : 5' -CATACTTATTCCTTGTGGCTGATGATATCATGGATC - 3' (配列番号: 6)

プライマー DNA (F77Y, T78S, V80I, I84L, 84PS85) : 5' -GTTCTTCATACTTATTCGCTTATTCATGATAGTATT - 3' (配列番号: 7) 及び 5' -ATTCATGATGATCTTCCATCGATGGATCAAGAT - 3' (配列番号: 8)

【0042】

尚、変異 (F77Y, T78S, V80I, I84L, 84PS85) の導入には 2 つのオリゴヌクレオチドを使用した。まず、5' -GTTCTTCATACTTATTCGCTTATTCATGATAGTATT - 3' (配列番号: 7) のオリゴヌクレオチドを用い実施例 3 に従い変異を導入し、実施例 4 に従い形質転換体を作製し、さらに得られたプラスミドに、5' -ATTCATGATGATCTTCCATCGATGGATCAAGAT - 3' (配列番号: 8) のオリゴヌクレオチドを用い変異を導入した。

【0043】

これらのヌクレオチドは、SacGGPS の 77 位のフェニルアラニン、78 位のスレオニン、80 位のバリン、81 位のヒスチジン及び 84 位のイソロイシンの内の少なくとも 1 個のアミノ酸をコードするコドンに変異が導入されており

、そして又は84位のイソロイシンと85位のメチオニンの間に挿入されたアミノ酸をコードするコドンが導入されているのに加えて、新たに制限酵素BspHIの切断部位(5' TCATGA 3')、EcoRV切断部位(5' GATATC 3')又はClaI切断部位(5' ATCGAT 3')が導入されるように設計されている。この、BspHI切断部位の導入ではコドンの縮重のためSacGGPS遺伝子がコードするアミノ酸配列は変化しないか、又は変異導入部位である。これらは、BstFPS遺伝子に置換変異が導入されると同時に制限酵素切断部位が新しく作られるので、適当な制限酵素で消化後のアガロースゲル電気泳動で置換変異導入されたプラスミドを検出するためのものである。

【0044】

これらプライマーDNAは以下の反応溶液中で37℃で30分間リン酸化をした後、70℃で10分間失活処理する。

10 pmol / μ l プライマーDNA	2 μ l
10x Kination緩衝液	1 μ l
10 mM ATP	1 μ l
H ₂ O	5 μ l
T4 ポリヌクレオチドキナーゼ	1 μ l

ただし、10x Kination緩衝液は、1000mM Tris-Cl (pH8.0)、100mM MgCl₂、70 mM DTT。

【0045】

実施例3. SacGGPS遺伝子の置換変異の導入

実施例2で作製した各プライマーDNAを用いてKunkel法によって実施例1で作製したプラスミドに置換変異を導入した。Kunkel法を行うにあたっては、宝酒造から市販されているMutan-Kキットを用いた。実験手順もMutan-Kキット添付の実験書にしたがった。プラスミドの置換変異は必ずしもKunkel法である必要はなく、例えば、ポリメラーゼ鎖反応法(PCR)を用いる方法でもまったく同じ結果を得ることができる。

【0046】

Mutan-Kキット中の大腸菌CJ236を宿主セルとしてプラスミドp

B s - S a c G G P S 中のチミン塩基がデオキシウラシル塩基に置き換わった一本鎖DNAを調製する。

得られた一本鎖DNAを鋳型にして相補鎖合成用プライマーDNAを下記のような反応溶液により65℃で15分処理し37℃で15分静置することによってアニーリングさせる。

一本鎖DNA	0.6 pmol
アニーリング緩衝液	1 μ l
プライマーDNA溶液 (実施例2)	1 μ l
H ₂ O	最終容積10 μ lにする

【0047】

ただし、アニーリング緩衝液は、200mM Tris-Cl (pH8.0)、100mM MgCl₂、50mM NaCl、10mM DTT。

さらに、25 μ lの伸長緩衝液、60ユニットの大腸菌DNAリガーゼ、ユニットのT4 DNAポリメラーゼを加え、25℃で2時間相補鎖合成反応させる。ただし、延長緩衝液は、50mM Tris-Cl (pH8.0)、60mM酢酸アンモニウム、5mM MgCl₂、5mM DTT、1mM NAD、0.5mM dNTP。

反応後、3 μ lの0.2M EDTA(pH8.0)を加え、65℃5分間処理することにより反応停止させる。

【0048】

実施例4. S a c G G P S 遺伝子の置換変異の導入された遺伝子を持つ形質転換体の作製

実施例3により作製したDNA溶液を用いて、下記のようにしてEscherichia coli XL1-Blue へCaCl₂ 法により形質転換した。別の方法、例えば、エレクトロポレーション法によっても同様の結果が得られる。宿主細胞もEscherichia coli XL1-Blue 以外の細胞例えばJM109等を用いても同様の結果が得られる。

【0049】

CaCl₂ 法によって得られた形質転換体は、形質転換体選択マーカであるアンピシリン含有寒天プレートにまき、37℃で一晩培養する。

上記の様にして得られた形質転換体のうちBspHI、EcoRV又はClaIのいずれかの切断部位をSacGGPSコード領域に持つ置換変異型pBs-SacGGPSプラスミドを選択した。選択した置換変異型pBs-SacGGPSプラスミドのSacGGPS遺伝子の変異されるアミノ残基に対するコドン周辺の塩基配列をダイデオキシ法によって決定した。その結果、下記のような5の変異型SacGGPS遺伝子を含むpBs-SacGGPSプラスミドが得られた。77位のアミノ酸から85位のアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。

【0050】

変異

塩基配列

T78F, H81A: 5' -TTTTCCTTGTGGCTGATGATATCATG -3'

(配列番号: 9)

T78F, H81L: 5' -TTTTCCTTGTGCTTGATGATATCATG -3'

(配列番号: 10)

F77Y, T78F, H81L: 5' -TATTCCTTGTGCTTGATGATATCATG -3'

(配列番号: 11)

F77Y, T78F, H81A: 5' -TATTCCTTGTGGCTGATGATATCATG -3'

(配列番号: 12)

F77Y, T78S, V80I, I84L, 84PS85: 5' -TATTCGCTTATTCATGATGATCTCCATCGATG -3'

(配列番号: 13)

野生型: 5' -TTTACGCTTGTGCATGATGATATTATG -3' (配列番号: 14)

【0051】

実施例5. 変異型プレニルニリン酸合成酵素の活性測定

実施例4で得られた5種の変異型および1種の野生型SacGGPS遺伝子を含む、計6種の形質転換体から下記のようにして粗酵素液を調製した。

2 x LB培地で一晚培養した形質転換体を遠心により集菌し、菌体破碎用緩衝液 (50mM リン酸カルシウム緩衝液 (pH5.8)、10mM β-メルカプトエタノール、1mM EDTA) に懸濁する。これを超音波破碎処理し4℃ 10,000r.p.m.、10分遠心処理後の上清を55℃で12時間熱処理し大腸菌由来のプレニルニリン酸

合成酵素活性を失活させた。これをさらに同条件で遠心処理し、その上清を粗酵素抽出液とした。さらに耐熱性を検討するためには60℃, 70℃又は80℃で(バシラス・ステアロサーモフィラス由来の酵素においては60℃, 65℃, 67℃又は70℃で)粗酵素抽出液を反応前に1時間インキュベーションした。反応は下記の反応溶液で55℃15分間行なった。

【0052】

[1- ¹⁴ C] イソペンテニルニリン酸 (1 Ci/mol)	2.5 nmol
アリル性ニリン酸 (ゲラニルニリン酸)	2.5 nmol
リン酸カリウム緩衝液 (pH 5.8)	1.0 mM
MgCl ₂	5 mM
酵素液	100 μg

H₂Oで200 μlにする。

反応後、反応溶液に飽和NaClを200 μl添加し、さらに1 mlの水飽和ブタノールを加え、攪拌、遠心し、二相分離させる。得られたブタノール層800 μlに液体シンチレーター3 mlを加えて、液体シンチレーションカウンターにより放射活性を測定する。結果を図2に示す。

【0053】

変異型プレニルニリン酸合成酵素においても変異前のゲラニルゲラニルニリン酸合成酵素と同等の熱安定性を示した。また、バシラス・ステアロサーモフィラス由来のファルネシルニリン酸合成酵素より高い熱安定性を示した。

残りのブタノール層は加温しながら窒素ガスを吹き付け溶媒を蒸発させて0.5 ml程度まで濃縮する。これに、メタノール2 mlとポテト酸性フォスファターゼ溶液(2 mg/mlポテト酸性フォスファターゼ、0.5 M酢酸ナトリウム(pH 4.7)) 1 mlを加え37℃で脱リン酸化反応を行なう。つぎに、n-ペンタン3 mlで脱リン酸化された反応産物を抽出する。

【0054】

これを、窒素ガス吹き付けにより溶媒を蒸発させて濃縮しこれをTLC(逆層TLCプレート: LKC18 (Whatman 社製)、展開溶媒: アセトン/水=9/1)により解析する。展開された脱リン酸化された反応産物はバイオイメージア

ナライザーBAS2000（富士写真フィルム社製）によって放射活性の位置を決定した。ゲラニルニリン酸をアリル性基質として用いた結果を図3に示す。

変異型プレニルニリン酸合成酵素においては反応生成物がファルネシルニリン酸であることを示した。

【0055】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：330

配列の型：アミノ酸残基

トポロジー：直鎖状

配列の種類：蛋白質

起源：

生物名：スルホロバス・アシドカルダリウス (Sulfolobus acidocaldarius)

株名：ATCC33909

配列の特徴：

特徴を表わす記号：アスパラギン酸リッチドメイン (Asp-rich domain)

存在位置：82-86

Met	Ser	Tyr	Phe	Asp	Asn	Tyr	Phe	Asn	Glu	Ile	Val	Asn	Ser	Val	Asn
				5					10					15	
Asp	Ile	Ile	Lys	Ser	Tyr	Ile	Ser	Gly	Asp	Val	Pro	Lys	Leu	Tyr	Glu
			20						25					30	
Ala	Ser	Tyr	His	Leu	Phe	Thr	Ser	Gly	Gly	Lys	Arg	Leu	Arg	Pro	Leu
			35						40					45	
Ile	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Asp	Leu	Phe	Gly	Gly	Gln	Arg	Glu	Arg	Ala
		50					55					60			
Tyr	Tyr	Ala	Gly	Ala	Ala	Ile	Glu	Val	Leu	His	Thr	Phe	Thr	Leu	Val
		65					70					75			80
His	Asp	Asp	Ile	Met	Asp	Gln	Asp	Asn	Ile	Arg	Arg	Gly	Leu	Pro	Thr
						85					90				95
Val	His	Val	Lys	Tyr	Gly	Leu	Pro	Leu	Ala	Ile	Leu	Ala	Gly	Asp	Leu
						100						105			110
Leu	His	Ala	Lys	Ala	Phe	Gln	Leu	Leu	Thr	Gln	Ala	Leu	Arg	Gly	Leu
						115						120			125

Pro Ser Glu Thr Ile Ile Lys Ala Phe Asp Ile Phe Thr Arg Ser Ile
130 135 140
Ile Ile Ile Ser Glu Gly Gln Ala Val Asp Met Glu Phe Glu Asp Arg
145 150 155 160
Ile Asp Ile Lys Glu Gln Glu Tyr Leu Asp Met Ile Ser Arg Lys Thr
165 170 175
Ala Ala Leu Phe Ser Ala Ser Ser Ser Ile Gly Ala Leu Ile Ala Gly
180 185 190
Ala Asn Asp Asn Asp Val Arg Leu Met Ser Asp Phe Gly Thr Asn Leu
195 200 205
Gly Ile Ala Phe Gln Ile Val Asp Asp Ile Leu Gly Leu Thr Ala Asp
210 215 220
Glu Lys Glu Leu Gly Lys Pro Val Phe Ser Asp Ile Arg Glu Gly Lys
225 230 235 240
Lys Thr Ile Leu Val Ile Lys Thr Leu Glu Leu Cys Lys Glu Asp Glu
245 250 255
Lys Lys Ile Val Leu Lys Ala Leu Gly Asn Lys Ser Ala Ser Lys Glu
260 265 270
Glu Leu Met Ser Ser Ala Asp Ile Ile Lys Lys Tyr Ser Leu Asp Tyr
275 280 285
Ala Tyr Asn Leu Ala Glu Lys Tyr Tyr Lys Asn Ala Ile Asp Ser Leu
290 295 300
Asn Gln Val Ser Ser Lys Ser Asp Ile Pro Gly Lys Ala Leu Lys Tyr
305 310 315 320
Leu Ala Glu Phe Thr Ile Arg Arg Arg Lys
325 330

【0056】

配列番号：2

配列の長さ：993

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

起源：

生物名：スルホロバス・アシドカルダリウス (Sulfolobus acidocaldarius)

株名：ATCC 33909

配列の特徴：特徴を表わす記号：アスパラギン酸-richドメインコード領域 (Asp-rich domain coding)

存在位置：246-258

```

ATGAGTACT TTGACAACTA TTTAATGAG ATTGTTAATT CTGTAAACGA CATTATTAAG 60
AGCTATATAT CTGGAGATGT TCCTAAACTA TATGAAGCCT CATATCATT GTTACATCT 120
GGAGGTAAGA GGTTAAGACC ATTAATCTTA ACTATATCAT CAGATTTATT CGGAGGACAG 180
AGAGAAAGAG CTTATTATGC AGGTGCAGCT ATTGAAGTTC TTCATACTTT TACGCTTGTG 240
CATGATGATA TTATGGATCA AGATAATATC AGAAGAGGGT TACCCACAGT CCACGTGAAA 300
TACGGCTTAC CCTTAGCAAT ATTAGCTGGG GATTTACTAC ATGCAAAGGC TTTTCAGCTC 360
TTAACCCAGG CTCTTAGAGG TTTGCCAAGT GAAACCATAA TTAAGGCTTT CGATATTTTC 420
ACTCGTTCAA TAATAATTAT ATCCGAAGGA CAGGCAGTAG ATATGGAATT TGAGGACAGA 480
ATTGATATAA AGGAGCAGGA ATACCTTGAC ATGATCTCAC GTAAGACAGC TGCATTATTC 540
TCGGCATCCT CAAGTATAGG CGCACTTATT GCTGGTGCTA ATGATAATGA TGTAAGACTG 600
ATGTCTGATT TCGGTACGAA TCTAGGTATT GCATTTTCTA TTGTTGACGA TATCTTAGGT 660
CTAACAGCAG ACGAAAAGGA ACTTGAAAG CCTGTTTTTA GTGATATTAG GGAGGGTAAA 720
AAGACTATAC TTGTAATAAA AACACTGGAG CTTTGTAAAG AGGACGAGAA GAAGATTGTC 780
CTAAAGGCGT TAGGTAATAA GTCAGCCTCA AAAGAAGAAT TAATGAGCTC AGCAGATATA 840
ATTAAGAAAT ACTCTTTAGA TTATGCATAC AATTTAGCAG AGAAATATTA TAAAAATGCT 900
ATAGACTCTT TAAATCAAGT CTCCTCTAAG AGTGATATAC CTGGAAAGGC TTAAAAATAT 960
CTAGCTGAAT TTACGATAAG AAGGAGAAAA TAA

```

【0057】

配列番号：3

配列の長さ：37

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

CATACTTTTT TCCTTGTGGC TGATGATATC ATGGATC

37

【0058】

配列番号：4

配列の長さ：37

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

CATACTTTTT TCCTTGTGCT TGATGATATC ATGGATC

37

【0059】

配列番号：5

配列の長さ：37

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

CATACTTATT TCCTTGTGCT TGATGATATC ATGGATC

37

配列番号：6

配列の長さ：37

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

CATACTTATT TCCTTGTTGGC TGATGATATC ATGGATC

37

【0060】

配列番号：7

配列の長さ：36

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

GTTCTTCATA CTTATTCGCT TATTCATGAT AGTATT

36

【0061】

配列番号：8

配列の長さ：33

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

ATTCATGATG ATCTTCCATC GATGGATCAA GAT

33

【0062】

配列番号：9

配列の長さ：27

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

TTTTTCCTTG TGGCTGATGA TATCATG

27

【0063】

配列番号：10

配列の長さ：27

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

TTTTTCCTTG TGCTTGATGA TATCATG

27

【0064】

配列番号：11

配列の長さ：27

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

TATTTTCCTTG TGCTTGATGA TATCATG

27

【0065】

配列番号：12

配列の長さ：27

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

TATTTTCCTTG TGGCTGATGA TATCATG

27

【0066】

配列番号：13

配列の長さ：33

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

TATTCGCTTA TTCATGATGA TCTTCCATCG ATG

33

【0067】

配列番号：14

配列の長さ：27

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

TTTACGCTTG TGCATGATGA TATTATG

27

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、各種プレニルニリン酸合成酵素の領域(I)～(V)、並びにアスパラギン酸リッチドメインI、を示す図である。図中、配列はゲラニルゲラニルニリン酸合成酵素のアミノ酸配列を示し、ATGERPYRSはArabidopsis thaliana、LA15778. pはLupinus albus、CAGERDIS. はCapsicum annuum、ATGGPSRP. はArabidopsis thaliana、GGPS-pepはSulfolobus acidocaldarius、SPCRT. pepはRhodobacter sphaeroides、RCPHSYNG. はRhodobacter capsulatus、EHCRTS. peはErwinia herbicola、MXCRTNODAはMyxococcus thaliana、NCAL3. pepはNeurospora crassa由来のものを示す。それぞれのアミノ酸配列の左側に記載されている数字は、それぞれのアミノ酸配列のN末端の、それぞれのゲラニルゲラニルニリン酸合成酵素におけるN末端側からの部位である。

【図2】

図2は、変異型プレニルニリン酸合成酵素の熱安定性を示す図である。縦軸は60℃でインキュベーション時の活性を100%とした相対活性を示す。横軸はインキュベーション温度を示す。SacGGPSは変異前のゲラニルゲラニルニリン酸合成酵素である。他はそれぞれの変異型酵素である。BstFPSはバシラス・テアロサーモフィラス由来のファルネシルニリン酸合成酵素である。

【図3】

図3は、ゲラニルニリン酸をアリル性基質としたときの変異型プレニルニリン酸合成酵素反応産物の脱リン酸化物の薄層クロマトグラフィーによる展開パターンを示す。図面代用写真である。図中ori. は展開のオリジン、s. f. はソルベントフロントを示す。

また、GOHはゲラニオール、FOHはファルネソール、GGOHはゲラニルゲラニルオール、GFOHはゲラニルファルネソールであり、それぞれゲラニルニリン酸、ファルネシルリン酸、ゲラニルゲラニルニリン酸、ゲラニルファルネシルニリン酸の脱リン酸化により生成する。SacGGPSは変異前のゲラニルゲラニルニリン酸合成酵素である。他はそれぞれの変異型酵素である。

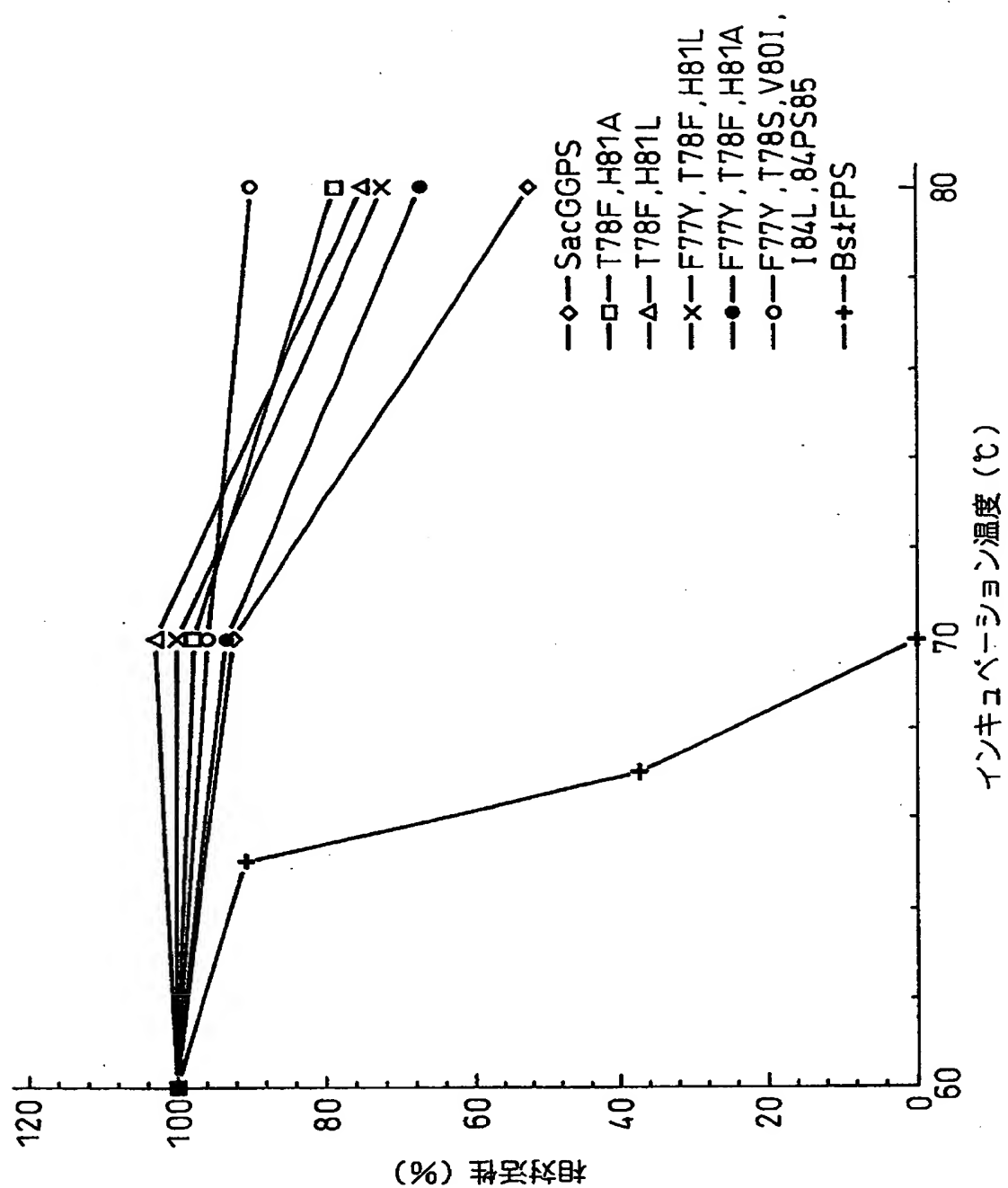
【書類名】

図面

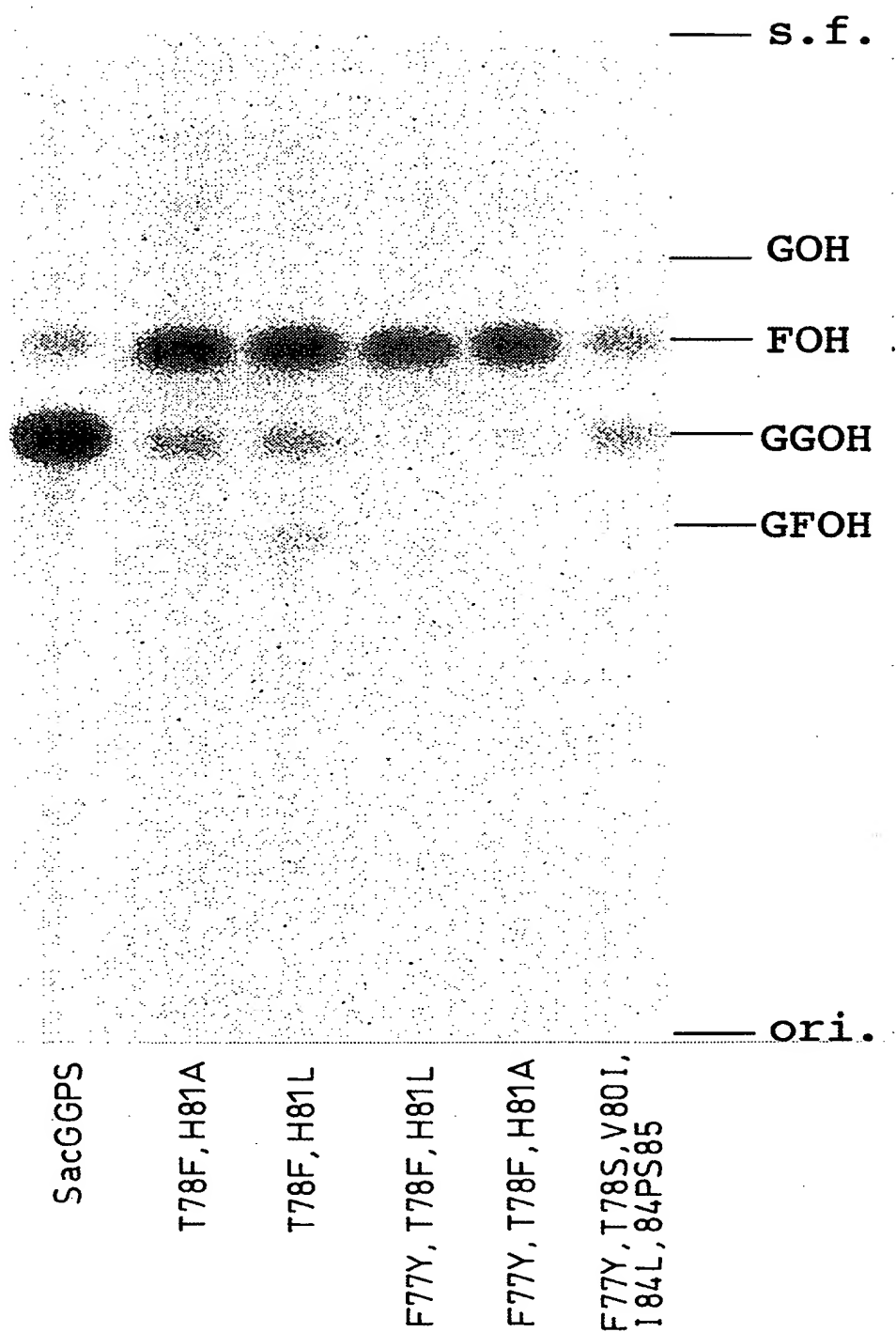
【図1】

領域Ⅰ		領域Ⅱ		領域Ⅲ	
ATGERPYRS	116 GGKRV	147 EMIHTMSLIHDDLPCMDNDDLRG	238 GQVVD		
LA15778. p	110	141	230		
CAGERDIS.	118	149	238 . . . A.		
ATGGPSRP.	88 . P . . AP	119 . . V . AA	211 . . Y . .		
GGPS. pep	43 L.	74 . VL . FT . V	160 . . A . .		
SPCRT. pep	64 . A . I .	95 . L . CA . V	185 . . GWE		
RCPHSYNG.	192 . A . I .	223 . LM . CA . V	313 . . AWE		
EHCRTS. pe	54 . _ . I .	86 . LT . A . ML . M	175 . . FR .		
MXCRTNODA	104 _ . . L .	136 . LL . FL	199 . . YL .		
NCAL3. pep	197 . _ . DI .	226 . L . A . LV	260 . . GM .		
領域Ⅳ		領域Ⅴ			
ATGERPYRS	265 KT	283 GLLFQVVDIL_DVTKSSK_ELKGKTAGKDLIADK			
LA15778. p	255 . .	283 . . M V			
CAGERDIS.	263 . .	291			
ATGGPSRP.	230 . F	256 . M . Y TE . KK . YDGGAE . GMMEMAEEL .			
GGPS. pep	185 . .	211 . IA . I GLTADEKE PVFS . IREG .			
SPCRT. pep	203 . .	227 . EA . . A . LR . . ALCDAE . T P . Q . E . HAR			
RCPHSYNG.	331 . .	355 . SA . . IA . . LK . . ALM . AE . AM . . P . . Q . IANER			
EHCRTS. pe	199 . .	225 . QA . . LL . . LRD . HPET DRN . . A . G .			
MXCRTNODA	226 . .	247 . . AY . LR . . L . GLFGD . NV . . A . . A . DG . FLQG .			
NCAL3. pep	286 . .	272 . . I . . IA . . YHNLWNREYT . . AN . GMCE TEG .			

【図2】



【図3】



図面代用写真

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 より短いプレニルニリン酸を合成することができる変異型プレニルニリン酸合成酵素の提供。

【解決手段】 プレニルニリン酸合成酵素において第二領域のアスパラギン酸リッチドメインDDXX (XX) D (Xは任意のアミノ酸を示し、カッコ内のXXは存在しない場合もある) 中又はその上流においてアミノ酸配列の修飾を施すことにより、生来の酵素より短いプレニルニリン酸を合成することができる変異型プレニルニリン酸合成酵素。

【選択図】 なし

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 000003207

【住所又は居所】 愛知県豊田市トヨタ町1番地

【氏名又は名称】 トヨタ自動車株式会社

【代理人】 申請人

【識別番号】 100077517

【住所又は居所】 東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門37森ビル 青和特許法律事務所

【氏名又は名称】 石田 敬

【代理人】 申請人

【識別番号】 100087871

【住所又は居所】 東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門37森ビル 青和特許法律事務所

【氏名又は名称】 福本 積

【代理人】 申請人

【識別番号】 100088269

【住所又は居所】 東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門37森ビル 青和特許法律事務所

【氏名又は名称】 戸田 利雄

【代理人】 申請人

【識別番号】 100082898

【住所又は居所】 東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門37森ビル 青和特許法律事務所

【氏名又は名称】 西山 雅也

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000003207]

1. 変更年月日	1990年 8月27日
[変更理由]	新規登録
住 所	愛知県豊田市トヨタ町1番地
氏 名	トヨタ自動車株式会社